

# Metode određivanja acetamida u elvitegraviru

---

Grgić, Franciska

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:764301>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Franciska Grgić

# **METODE ODREĐIVANJA ACETAMIDA U ELVITEGRAVIRU**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2020.



Ovaj diplomski rad izrađen je u TAPI Pliva R&D Analitika pod mentorstvom prof. dr. sc.  
Nives Galić i neposrednim voditeljstvom Zlate Lasić, mag.chem.



## **Zahvale**

*Veliku zahvalnost, u prvom redu dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nives Galić koja mi je pomagala svojim savjetima prilikom pisanja i izrade diplomskog rada, i što je uvijek imala strpljenja i vremena za moje brojne upite i podržavala moje ideje u znanstvenom radu.*

*Veliko hvala neposrednim voditeljima Zlati Lasić, mag.chem i dr.sc. Mislavu Runje na pruženoj prilici, prenošenju znanja, iskustava i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.*

*Hvala dragim kolegama i kolegicama u Osijeku i Zagrebu koji su svojom potporom i društvom uljepšali protekle godine studiranja i učinili studentske dane uistinu prekrasnim razdobljem. Posebno hvala mojoj Gabi na velikom prijateljstvu, smijehu i suzama, nesebičnoj pomoći i vjeri u mene.*

*I na kraju, najveće hvala mojoj dragoj obitelji, mojoj majci, sestrama i teti, koji su uvijek bili TU, uz mene u teškim i sretnim trenucima i bez kojih ovo sve što sam do sada postigla ne bi bilo moguće. Mama hvala na žrtvi i odricanju čime si mi omogućila lijep i lagodan studentski život.*

*Veliko HVALA svima!*



## Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Elvitegravir .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. <i>Formulacije antivirotika .....</i>	<i>3</i>
<b>2.2. HIV-infekcija.....</b>	<b>4</b>
2.2.1. <i>Karakteristike virusa HIV .....</i>	<i>4</i>
2.2.2. <i>Infekcija humanih stanica .....</i>	<i>4</i>
2.2.3. <i>Simptomi i razvoj bolesti u čovjeka.....</i>	<i>5</i>
2.2.4. <i>Faze infekcije HIV.....</i>	<i>6</i>
<b>2.3. Onečišćenja u aktivnim farmaceutskim tvarima .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4. Validacija .....</b>	<b>11</b>
2.4.1. <i>Specifičnost .....</i>	<i>12</i>
2.4.2. <i>Linearnost .....</i>	<i>13</i>
2.4.3. <i>Granice detekcije i kvantifikacije.....</i>	<i>13</i>
2.4.4. <i>Točnost.....</i>	<i>13</i>
2.4.5. <i>Preciznost.....</i>	<i>13</i>
2.4.6. <i>Robusnost.....</i>	<i>14</i>
<b>2.5. Kromatografija.....</b>	<b>15</b>
2.5.1. <i>Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....</i>	<i>16</i>
2.5.2. <i>Kromatografski parametri .....</i>	<i>17</i>
2.5.3. <i>Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti.....</i>	<i>19</i>
<b>2.6. Spektrometrija masa.....</b>	<b>19</b>
<b>2.7. Program DryLab.....</b>	<b>21</b>



---

<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Popis polaznog materijala i kemikalija .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Priprema mobilne faze i diluenta.....</b>	<b>23</b>
<b>3.3. Priprema otopina za UHPLC analizu .....</b>	<b>24</b>
<b>3.4. Kromatografski uvjeti za određivanje acetamida u elvitegraviru.....</b>	<b>25</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Uvjeti i optimizacija parametara spektrometra masa .....</b>	<b>26</b>
<i>4.1.1. Energija sraza.....</i>	<i>26</i>
<i>4.1.2. Temperatura plina.....</i>	<i>27</i>
<i>4.1.3. Napon na kapilari .....</i>	<i>27</i>
<i>4.1.4. Parametri spektrometra masa.....</i>	<i>28</i>
<b>4.2. Optimizacija UPLC metode .....</b>	<b>29</b>
<i>4.2.1. Odabir stacionarne faze.....</i>	<i>29</i>
<i>4.2.2. Odabir modifikatora .....</i>	<i>29</i>
<i>4.2.3. Odabir otapala u pokretnoj fazi.....</i>	<i>31</i>
<i>4.2.4. Optimalni kromatografski uvjeti za određivanje acetamida u elvitegraviru.....</i>	<i>31</i>
<b>4.3. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4. Validacija metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za određivanje acetamida.....</b>	<b>33</b>
<i>4.4.1. Specifičnost i selektivnost.....</i>	<i>33</i>
<i>4.4.2. Linearnost .....</i>	<i>33</i>
<i>4.4.3. Granice kvantifikacije i detekcije.....</i>	<i>34</i>
<i>4.4.4. Točnost i iskorištenje .....</i>	<i>35</i>
<i>4.4.5. Preciznost.....</i>	<i>36</i>
<i>4.4.6. Stabilnost.....</i>	<i>37</i>
<i>4.4.7. Robusnost.....</i>	<i>38</i>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>39</b>

---

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	40
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	42
§ 8. ŽIVOTOPIS .....	IX





Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### METODE ODREĐIVANJA ACETAMIDA U ELVITEGRAVIRU

Franciska Grgić

Elvitegravir je inhibitor HIV-1 integraze koji se u kombinaciji s drugim lijekovima koristi za liječenje infekcije virusom humane imunodeficijencije (HIV). Inhibiranjem enzima integraze, elvitegravir smanjuje količinu HIV-a u tijelu, te sprječava njegovo daljnje razmnožavanje. Ispitivanje čistoće lijeka uključuje analitičke metode kojima je cilj detekcija, identifikacija, strukturna karakterizacija i kvantitativno određivanje onečišćenja. U ovom diplomskom radu razvijena je brza i učinkovita metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) za analizu acetamida u elvitegraviru. S obzirom da je acetamid molekula male molekulske mase, koristile su se tehnike tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti uz detekciju detektorom s nizom dioda (UHPLC-DAD) i trostrukim kvadrupolom (UHPLC-QQQ). Metode razvijene u diplomskom radu su validirane.

(54 stranice, 6 slika, 21 tablica, 33 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski...)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: acetamid, elvitegravir, kromatografija, onečišćenje, UHPLC

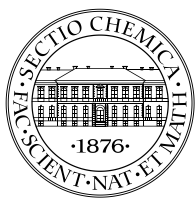
Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić  
Neposredni voditelj: Zlata Lasić, mag.chem.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić.
  2. prof. dr. sc. Željka Soldin
  3. doc. dr. sc. Morana Dulić
- Zamjena: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Datum diplomskog ispita: 27. veljače 2020.





University of Zagreb

Faculty of Science

**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### METHODS FOR ACETAMIDE DETERMINATION IN ELVITEGRAVIR

Franciska Grgić

Elvitegravir is an HIV-1 integrase inhibitor, which is used in combination with other active pharmaceutical ingredients as a treatment of the human immunodeficiency virus (HIV). By inhibiting enzyme integrase, elvitegravir is lowering the amount of HIV in the human body and inhibits its further propagation. Analysis of pharmaceutical impurities includes analytical procedures with aim to detect, identify, structurally characterize and quantify the impurity. In present study we developed fast and reliable method of ultra-high performance liquid chromatography for determination of acetamide in elvitegravir. Acetamide is a molecule of low molar mass, that is why we used the diode array detector (UHPLC-DAD) and triple quadrupole detector (UHPLC-QQQ). Methods developed in this research work are validated.

(54 pages, 6 figures, 21 tables, 33 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: acetamide, elvitegravir, chromatography, impurity, UHPLC

Mentor: Dr. Nives Galić, Professor

Assistant mentor: Zlata Lasić, mag.chem.

Reviewers:

1. Dr. Nives Galić, Professor
  2. Dr. Željka Soldin, Professor
  3. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Date of exam: 27<sup>th</sup> February 2020.



## § 1. UVOD

Prije svakog korištenja lijeka potrebno je detektirati i kvantificirati onečišćenja koja se u njemu nalaze. Onečišćenja u lijekovima su neželjene tvari koje uz aktivnu farmaceutsku tvar nastaju tijekom proizvodnog procesa ili razgradnjom lijeka. Takva onečišćenja potencijalno su toksična i karcinogena, mogu uzrokovati neželjene učinke, utjecati na farmaceutsku aktivnost i stabilnost lijeka. Za svaku vrstu onečišćenja postoji zakonska regulativa koja propisuje dopuštene granice onečišćenja. Zadatak suvremenih analitičkih metoda je detekcija, identifikacija, strukturna karakterizacija i kvantitativno određivanje onečišćenja u skladu s propisanim strogim kontrolama lijekova.<sup>1</sup>

Aktivna farmaceutska tvar elvitegravir je inhibitor HIV-1 integraze.<sup>2</sup> U kombinaciji s drugim lijekovima koristi se za liječenje HIV-1 infekcije. Za analizu elvitegravira koristi se tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrijom masa.<sup>3,4</sup>

U ovom radu razvijena je metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za analizu acetamida u elvitegraviru.

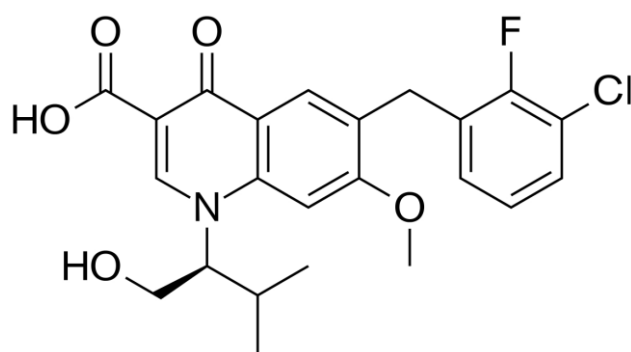


## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Elvitegravir

Elvitegravir je aktivna farmaceutska tvar koja se u kombinaciji s drugim sličnim lijekovima koristi za liječenje HIV-1 infekcije. U daljnjem tekstu će se za elvitegravir koristiti kratica ELV. Molekulska formula ELV-a je  $C_{23}H_{23}ClFNO_5$ , kemijski naziv spoja je: 6-(3-kloro-2-fluorobenzil)-1-[(2S)-1-hidroksi-3-metilbutan-2-il]-7-metoksi-4-okso-1,4-dihidroksikinolin-3-karbonsilna kiselina, te njegova molarna masa iznosi  $447,883 \text{ g mol}^{-1}$  (slika 1). Navedeni spoj je visoko lipofilan ( $\log D=4,5$  pri  $\text{pH}=6,8$ ).

U mnogim studijama modeliranja pokazano je učinkovito vezanje elvitegravira na retroviralnu integrazu što proizlazi iz  $\beta$ -ketonske skupine i funkcionalnih skupina karboksilnih kiselina koje imaju koplanarnu konformaciju sličnu di-keto kiselinskim derivatima, koji se koriste kao inhibitori integraze. Obzirom na karboksilnu skupinu, topljivost elvitegravira u vodenim otopinama raste pri većim pH-vrijednostima.<sup>5</sup>



Slika 1. Strukturna formula elvitegravira

U posljednje vrijeme antivirusna terapija doživljava velik napredak, a zbog primjene terapije HAART (engl. *Highly active antiretroviral treatment*, HAART) je bolja prognoza oboljelih od HIV-a. Meta novijih antivirusnih lijekova je enzim HIV-1 integraza. HIV-1 integraza provirusnu DNA ugrađuje u kromosomsku DNA stanice domaćina. Stoga inhibitori HIV-1 integraze ne spriječavaju ulazak HIV-1 virusa u stanicu domaćina, već onemogućuju

ugradnju viralne DNA u genom stanice domaćina. Velika prednost navedenog mehanizma djelovanja farmaceutika je upravo da humani proteom ne posjeduje analog HIV-1 integraze. Tri jedinstvena i esencijalna enzima za preživljavanje HIV-a u organizmu su integraza, proteaza i reverzna transkriptaza te su stoga idealne mete za razvoj molekula koje će inhibirati HIV virus. Tetramerna HIV-1 integraza je enzim koji katalizira navedenu ugradnju reakcijom u dva koraka. Oba koraka zahtijevaju dvovalentne ione ( $Mg^{2+}$  ili  $Mn^{2+}$ ) koji su koordinirani u aktivnom mjestu integraze, katalitičkom trijadom karboksilnih aminokiselinskih ostataka.<sup>6</sup>

### 2.1.1. Formulacije antivirotika

Elvitegravir se kao aktivna farmaceutska tvar na tržištu može pronaći kao samostalana aktivna tvar u formulaciji, pod komercijalnim imenima Vitekta®, uz koje je nužno korištenje i drugih antivirotika. Elvitegravir se može naći i u formulaciji s drugim s još tri antivirusne supstancije (kobicistat, emtricitabin i tenofovirdizoproksil), odnosno s četiri djelatne tvari poznata je pod komercijalnim imenom Stribild®. Elvitegravir je vrsta antivirusne tvari koja inhibira enzim integrazu virusa HIV-1, koji je povezan s replikacijom virusa, čime smanjuje mogućnost uobičajenog umnažanja virusa i usporava njegovo širenje. Kobicistat pojačava učinak elvitegravira time što produljuje njegovo vrijeme djelovanja. Tenofovirdizoproksil je „prolijek”, što znači da se u tijelu pretvara u aktivnu (djelatnu) tvar tenofovir. Tenofovir i emtricitabin blisko su povezane vrste antivirusnih lijekova koji djeluju kao inhibitori reverzne transkriptaze. Enzim reverzna transkriptaza je enzim kojeg stvara HIV-1, a koji virusu omogućuje umnožavanje u tijelu. Blokirajući reverznu transkriptazu i integrazu, Stribild® smanjuje ukupnu količinu virusa u krvi te je održava na niskoj razini.<sup>7</sup> Nadalje, pored dvije navedene formulacije, elvitegravir je i sastojak formulacije lijeka pod komercijalnim imenom Genvoya® koja sadrži gore navedene 4 aktivne tvari. Jedina razlika između dvije navedene formulacije je u količini i obliku tenofovir aktivne tvari. U Genvoya® formulaciji on se nalazi u obliku tenofoviralafenamid fumarata.

Elvitegravir se prvenstveno metabolizira kroz crijeva i jetrene enzime citokrome P450 te se stoga njegov farmakokinetički učinak može pojačati s niskim dozama ritonavira ili s farmaceutskim pojačivačem kobicistatom. Oba pojačivača djeluju sličnim mehanizmom, sličnim kao i par inhibitora HIV proteaze. Uporaba elvitegravira u kombinaciji s drugim aktivnim farmaceutski aktivnim tvarima kao što su ritonavir ili kobicistat pokazala se zaista

dobrom, rezultirala je zadržavanjem visokih doza u organizmu i dugim vrijeme eliminacije, čime je omogućeno uzimanje doze samo jednom dnevno.<sup>7</sup>

## 2.2. HIV-infekcija

### 2.2.1. Karakteristike virusa HIV

Virus humane imunodeficijencije je u grupi virusa *Letinoviridae* unutar porodice *Retroviridae*, potporodici *Orthoretrovirinae*.<sup>8</sup> S obzirom na genetske karakteristike i razlikovanje u virusnim antigenima, HIV je klasificiran na tipove 1 i 2 (HIV-1 i HIV-2). Epidemiološke i filogenetske analize koje su trenutno dostupne pokazuju da je HIV prešao na ljudsku populaciju između 1920. i 1940.-ete godine. HIV-1 i HIV-2 virusi su evoluirali iz ne-humanog virusa, tj. od virusa imunodeficijencije primata s područja centralne Afrike.<sup>8</sup>

Genom HIV-a sadržava dvije identične kopije jednostruke RNA molekule koje se nalaze u središtu virusne čestice- kapside. Genom HIV virusa je provirus, odnosno proviralna DNA, koja se aktivira reverznom transkripcijom proviralne RNA, a potom ugrađuje svoju dvostruku nukleinsku kiselinu u humani genom uz pomoć enzima integraze. S obzirom na podrijetlo virusa, struktura genoma virusa imunodeficijencije koji potječu od primata je identičan genomu humanog HIV-1 virusa.<sup>9</sup>

### 2.2.2. Infekcija humanih stanica

Virusna čestica se vrlo lako veže na receptor na membrani stanice domaćina, nakon čega slijedi fuzija membrane humane stanice, čime se virusna čestica unosi u stanicu. Nakon toga se kapsida zbog djelovanja endosoma otvara i sadržaj kapside se ispušta u citoplazmu humane stanice. Upravo se u citoplazmi događa aktivacija reverzne transkriptaze. Reverzna transkriptaza HIV-a transkribira jednostruki virusni RNA genom na cDNA, paralelno se uz pomoć DNA-polimeraze sintetizira i drugi antiparalelni DNA lanac po kalupu cDNA, istovremeno se RNA lanac razgrađuje enzimatski s RNA-zom.<sup>8</sup>

Proviralna DNA se transportira u jezgru kroz jezgrine pore, u obliku kompleksa koji sadržava enzim integrazu i linearnu provirusnu DNA. Tada integraza ugrađuje nasumični provirusni genom u genom stanice domaćina. Integracija proviralne DNA finalizira HIV-1

infekciju stanice i uspostavlja dosljednu infekciju u organizmu. Proviralni genom može biti repliciran zasebno ili kao dio genoma stanice domaćina tijekom stanične diobe.<sup>8</sup>

### 2.2.3. *Simptomi i razvoj bolesti u čovjeka*

Put prijenosa HIV-1 virusa je seksualnim kontaktom, krvlju i mlijekom. Virus se ne širi zrakom, vodom ili običnim fizičkim kontaktom. HIV virus napada imunološki sustav, ukoliko se ne liječi HIV inficira i ubija CD4 stanice, tip imunoloških stanica koje se još nazivaju i T stanice ili T- limfociti. S vremenom HIV ubija sve više i više CD4 stanica čime se uništava imunološki sustav čovjeka. Ovakvo stanje dovodi do različitih vrsta infekcija, tumora, a na kraju i AIDS-a (engl. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) odnosno sindroma stečene imunodeficijencije. Tada je imunološki sustav preslab da bi se borio s bolestima i infekcijama. Ukoliko se ne liječi, životni vijek osoba s AIDS-om je oko tri godine.<sup>10</sup>

Za HIV danas ne postoji lijek koji može u potpunosti izliječiti infekciju, no s valjanom medicinskom skrbi koje uključuje i terapiju HAART, infekciju HIV je moguće držati pod kontrolom i živjeti s virusom dugi niz godina. S antiretroviralnom terapijom, HIV se može kontrolirati i životni vijek oboljelih je gotovo jednak kao u zdravih osoba.<sup>10</sup>

Kada ljudi dobiju HIV, ukoliko ne prime nikakvu medicinsku skrb niti liječenje, uobičajeno je da će bolest uznapredovati kroz tri faze. Lijekovi za liječenje HIV-a, terapija HAART, pomažu oboljelima kroz sve faze bolesti, ukoliko se uzimaju kako je propisano. Terapija može usporiti ili prevenirati progresiju od jedne faze ka sljedećoj. Osobe koje terapiju uzimaju kako je propisano, mogu dostići razine virusa ispod detekcijskih i na taj način nemaju rizik za prijenos HIV-a na zdrave osobe seksualnim putem, preko inficirane krvi, niti prilikom dojenja, preko mlijeka.<sup>11</sup>

#### 2.2.4. Faze infekcije HIV

Faza 1. → Akutna HIV- infekcija

Unutar 2-4 tjedna nakon zaraze HIV-om, uobičajeni simptom su nalik gripi, i mogu trajati nekoliko tjedana. Ovo je uobičajeni odgovor tijela na infekciju. Tijekom ove fazi bolesnici u tijelu imaju veliku količinu virusnih čestica u tijelu i vrlo su zarazni. Ali isto tako ljudi koji imaju akutnu infekciju HIV-om su najčešće nesvjesni da imaju infekciju jer se ne osjećaju bolesno odmah ili uopće. Da bi se saznalo ima li osoba akutnu HIV- infekciju potrebno je napraviti testove.<sup>11</sup>

Faza 2. → Klinička latencija ( HIV- neaktivnost ili mirovanje)

Ova se faza još naziva i asimptomatska HIV- infekcija ili kronična HIV- infekcija. Tijekom ove faze HIV je još uvijek aktivan, ali se reproducira u vrlo niskim razinama. Ljudi ne moraju imati nikakve simptome niti biti bolesni tijekom ovog perioda. Za neke ljude koji ne uzimaju terapiju za HIV, ovaj period može trajati primjerice jedno desetljeće ili čak duže, dok kod drugih ljudi se može dogoditi brza progresija bolesti u sljedeću fazu. Za bolesnike koji uzimaju antiretroviralnu terapiju, ova se faza može održati i po nekoliko desetaka godina. Bitno je naglasiti da se tijekom ove faze virus može prenositi na druge zdrave osobe. Naravno ukoliko se bolesnici pridržavaju propisane terapije, mogu znatno smanjiti razine virusa u tijelu i na taj način smanjiti rizik od prijenosa virusa na zdrave osobe ili partnere tijekom seksualnog kontakta. Ukoliko bolest nije liječena, dolazi do progresije i pri kraju ove faze se povećava broj virusa HIV-a, zbog čega se i smanjuje broj CD4 stanica u organizmu oboljele osobe. Daljnji nepredak bolesti prelazi dovodi do prelaska oboljele osobe u fazu 3.<sup>11</sup>

Faza 3. → Simptom stečene imunodeficijencije ( AIDS )

AIDS (engl. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) je najteži oblik HIV infekcije. Ljudi s AIDS-om imaju vrlo teško oštećenje imunološkog sustava, zbog čega postoji velika vjerojatnost za povećani broj bolesti i infekcija. Bez liječenja osobe s AIDS-om uobičajeno prežive oko tri godine. Uobičajeni simptomi AIDS-a uključuju zimicu, vrućicu, znojenje, otečene limfne

čvorove, slabost, gubitak težine. Ljudi s AIDS-om uobičajeno imaju velik broj virusnih čestica i vrlo su zarazni.<sup>11</sup>

### 2.3. Onečišćenja u aktivnim farmaceutskim tvarima

Nečistoće u aktivnim farmaceutskim tvarima su neželjene kemikalije koje zaostaju u aktivnim farmaceutskim tvarima, a mogu nastati tijekom procesa proizvodnje farmaceutske tvari, tijekom proizvodnje formulacije ili prilikom starenja farmaceutske tvari. Nečistoća u sastojku lijeka definirana je prema Međunarodnoj konferenciji o harmonizaciji (engl. *International conference on Harmonisation Guidelines*, ICH) kao bilo koji sastojak aktivne farmaceutske tvari koja nije kemijski entitet definiran kao aktivna farmaceutska tvar.<sup>12</sup> Prisutnost neželjenih kemikalija čak i samo u tragovima može imati utjecaj na učinkovitost i sigurnost farmaceutskog proizvoda. Kontrola nečistoća i pročišćavanje farmaceutski aktivnih tvari trenutno u farmaceutskoj industriji predstavlja kritični problem obzirom na to da su neželjni učinci nečistoća često teratogeni, mutageni ili karcinogeni.<sup>13</sup> Genotoksini su podgrupa farmaceutskih nečistoća koji mogu imati karcinogene učinke, promovirati mutacije na genetskoj razini, prekrajati kromosomski materijal ili raditi druga oštećenja DNA.<sup>14</sup> S obzirom da sinteza aktivnih farmaceutskih tvari vrlo često uključuje uporabu reaktivnih reagensa za nastanak intermedijera i kasnije za nastanak aktivne farmaceutske tvari, male količine reagensa ili nusprodukata mogu biti prisutne u konačnom proizvodu kao nečistoće.<sup>15</sup>

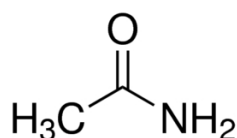
Intenzivnim razvojem suvremene farmaceutske industrije, jednako intenzivno se razvijaju i analitičke metode s izrazito visokim zahtjevima. Razvoj metode za analizu aktivnih tvari u farmaceutskoj industriji je proces koji se obično sastoji od nekoliko koraka, a prvi korak je određivanje onečišćenja, što obuhvaća njihovu strukturnu karakterizaciju, kvantitativno određivanje u aktivnoj tvari i gotovom lijeku, procjenu sigurnosti svakog pojedinog onečišćenja, a potom slijedi test prisilne razgradnje (engl. *stress tests*). Testom prisilne razgradnje dobivaju se informacije o glavnim putevima degradacije lijeka, kinetici razgradnje i vremenu poluraspada u različitim uvjetima razgradnje. Poznavanje razgradnje je vrlo bitno jer omogućuje prepoznavanje potencijalnih razgradnih onečišćenja, koja se onda mogu detektirati prilikom primjerice pripreme formulacije lijeka. Nakon preliminarno provedenih eksperimenata i identifikacije onečišćenja i razgradnih produkata, svi dobiveni rezultati se koriste u svrhu optimizacije metoda, kako bi svaka razvijena metoda našla svrhu u kontroli kvalitete farmaceutske proizvodnje. Optimizaciju metode u novije vrijeme provode računalni programi, koji na temelju preliminarnih eksperimenata predviđaju parametre za dobivanje boljeg razlučivanja, a potom se predviđeni parametri provjeravaju eksperimentalno. Danas često

korišten program pri razvoju kromatografskih metoda je DryLab® (Molnar institute- Berlin, Njemačka).<sup>16</sup>

Svi gore opisani postupci u farmaceutskoj industriji primjenjeni su za analizu aktivne farmaceutske tvari elvitegravir. Kombinacijom kromatografskih tehnika i spektrometrije masa detektirana su onečišćenja u elvitegraviru, a optimizacija kromatografskih uvjeta uz pomoć DryLab® softvera pokazala se kao izrazito uspješnim alatom koji znatno skraćuje vrijeme razvoja metode. Forsirana razgradnja elvitegravira provedena je hidrolizom u kiselini i lužini, oksidacijom u peroksidu, dok zagrijavanjem nije došlo do razgradnje aktivne tvari.<sup>17</sup>

### 2.3.1. Acetamid

Acetamid, organski spoj formule  $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ , je najjednostavniji amid i derivat je octene kiseline. Najčešće se koristi kao plastifikator ili kao industrijsko otapalo.<sup>14</sup> Acetamid se smatra intermedijerom između acetona (dvije metilne skupine ( $\text{CH}_3$ ) između kojih je karbonilna skupina ( $\text{CO}$ )) i uree (dvije amidne skupine ( $\text{NH}_2$ ) umjesto metilnih). Struktura acetamida prikazana je na slici 2. Acetamid može nastati prilikom hidrolize acetonitrila ukoliko se koristi vodena otopina acetonitrila s jakim kiselinom. Potencijalno je karcinogen za čovjeka s obzirom na postojeće podatke o toksičnosti za glodavce te jer posjeduje sposobnost interakcije s DNA. Često ga se može pronaći kao nečistoća nastala tijekom farmaceutske proizvodnje. Prema podacima iz literature testovi akutne izloženosti na štakorima i miševima su pokazali da acetamid ima nisku do umjerenu toksičnost pri oralnoj konzumaciji, a kod ljudi pri akutnoj izloženosti uzrokuje blage kožne iritacije.<sup>18</sup>



Slika 2. Strukturna formula acetamida,  $M_r=59,037$

Uklanjanje nečistoće kao što je to acetamid uključuje više koraka i postupke poput rekristalizacije, frakcijske destilacije i različitih kromatografskih tehnika. Navedene tehnike pročišćavanja su vremenski dugotrajne te vode do velikih gubitaka aktivne farmaceutske tvari čime se povećava trošak njene proizvodnje.<sup>16</sup> Otuda proizlazi potreba za novim tehnikama



pročišćavanja koje omogućuju separaciju genotoksina i drugih nečistoća od aktivnih farmaceutskih tvari. Selektivno pročišćavanje aktivne farmaceutske tvari se provodi inovativnim selektivnim sorbensima u čvrstom stanju ili molekularno utisnutim polimerima koji su naneseni ili na membrane ili na kromatografske kolone. Molekularno utisnuti polimeri, u daljnjem tekstu MIP (*engl. Molecularly imprinted polymers*) je tehnika koja se u posljednje vrijeme pokazala jednostavnim i vrlo jeftinim načinom pripreme struktura koje imaju određeni afinitet za pojedine molekule. Navedena tehnika korištena je za pripremu molekularno utisnutih polimera i u organskim otapalima i u alternativnim otapalima kao što je to superkritični- CO<sub>2</sub>, za primjenu u različitim područjima.<sup>19-21</sup>

## 2.4. Validacija

U farmaceutskoj industriji, validacija igra vrlo važnu ulogu u kontroli i osiguranju kvalitete. Validacija je sistematičan način za ispitivanje i osiguravanje prikladnosti metode, kako bi se dobili zadovoljavajući i postojani rezultati korištenim metodama. Validacija je proces kojim se pri uvođenju bilo koje metode u analitički laboratorij provjeravaju parametri izvođenja neke metode, odnosno utvrđuje udovoljava li metoda zahtjevima za namijenjenu primjenu. Dobra proizvođačka praksa predlaže da je kvaliteta ugrađena u krajnji proizvod, stoga farmaceutski proizvodi moraju održavati visoku kvalitetu i osigurati sigurnu i učinkovitu uporabu, što se nastoji osigurati točnim i provjerenim analitičkim metodama.<sup>22,23</sup>

Prema Međunarodnoj konferenciji o harmonizaciji (engl. *International conference on harmonization*, ICH) i Europskoj medicinskoj agenciji, metode su klasificirane unutar četiri kategorije i točno su navedeni parametri koji se trebaju uzeti u obzir za validaciju različitog tipa metoda.<sup>22</sup>

- Kategorija 1: Analitičke metode za kvantifikacijska mjerenja glavnih sastojka lijeka ili aktivne tvari uključujući i konzervanse u konačnim farmaceutskim proizvodima – analiza sadržaja.
- Kategorija II: Analitičke metode za određivanje nečistoća i degradacijskih produkata u konačnim farmaceutskim proizvodima – analiza tragova.
- Kategorija III: Analitičke metode za određivanje parametara učinka (npr. otapanje ili otpuštanje lijeka).
- Kategorija IV: Testovi identifikacije.

Pojedini parametri koji se moraju validirati obzirom na tip analitičke metode dani su u tablici 1.

Tablica 1. Validacijski parametri potrebni za validaciju analitičkih metoda prema ICH-u<sup>22</sup>

Validacijski parametar	Identifikacija (kategorija I)	Analiza tragova (kategorija II)		Kategorija III	Kategorija IV
		Kvanitativna	Limit test		
Točnost	+	+	*	*	
Preciznost	+	+		+	
Specifičnost	+	+	+	*	+
Granica detekcije			+	*	
Granica kvanifikacije		+		*	
Linearnost	+	+		*	
Područje primjene	+	+	*	*	
Robusnost	+	+		+	

+ upućuje da parametar mora biti uzet u obzir

\* upućuje da parametar može biti uzet u obzir prilikom validacije ovisno o prirodi testa

#### 2.4.1. Specifičnost

Specifičnost analitičke metode je definirana kao stupanj do kojeg metoda može kvantificirati analit u prisutnosti drugih komponenata smjese bez interferencija. Druge komponente mogu uključivati nečistoće, razgradne produkte ili matricu, te se ponašaju slično kao i analit. Najosnovniji kriterij dobre kromatografske separacije je da se pikovi ne preklapaju, odnosno da se postigne dobro razlučivanje pikova. Specifičnost kod kromatografskih tehnika se može procijeniti na temelju oblika, simetrije pikova ili primjerice testa čistoće pikova.

#### 2.4.2. *Linearnost*

Linearnost neke metode je područje linearne ovisnosti izmjerene vrijednosti i koncentracije analita. Za kromatografske metode odnosi se na linearnu korelaciju između odgovora detektora (visina ili površina pika) i koncentracije tvari u uzorku. Korelacija se može direktno ispitati analizom otopina pripremljenih razrijeđivanjem osnovne standardne otopine nekog lijeka ili sastojka lijeka.

#### 2.4.3. *Granice detekcije i kvantifikacije*

Granica detekcije (engl. *Limit of detection*, LOD) je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne nužno i kvantificirati kao precizna (egzaktna) vrijednost. LOD je parametar limit testova (testovi koji samo određuju je li koncentracija analita iznad ili ispod određene vrijednosti). U analitičkim metodama najčešće se procjenjuje na temelju omjera signal:šum ( $S/N$ ), koji treba biti veći od 3.

Granica kvantifikacije (engl. *Limit of quantification*, LOQ) najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s prikladnom preciznošću i točnošću. Za analitičke postupke LOQ se najčešće procjenjuje iz omjera signal: šum ( $S/N$ ), koji za LOQ treba biti veći od 10.

#### 2.4.4. *Točnost*

Točnost izražava bliskost poklapanja između vrijednosti eksperimentalno dobivenih rezultata i očekivane, referentne ili unaprijed utvrđene vrijednosti. Točnost se definira i kao iskorištenje (engl. *Recovery*) metode od točno poznatih dodanih količina analita. Uzorci sa standardnim dodatkom (engl. *spiked placebos*) se pripremaju tako da pokrivaju 50%-150% koncentracije pripremljenog nominalnog uzorka.

#### 2.4.5. *Preciznost*

Preciznost je analitički parameter koji izražava bliskost i slaganje rezultata između serije mjerenja višestruko uzorkovanog istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima.

Preciznost može biti razmotrena na tri razine: ponovljivost (engl. *Repeatability*), međupreciznost (engl. *Intermediate precision*) i obnovljivost (engl. *Reproducibility*). Ponovljivost je preciznost pod istim radnim uvjetima unutar kratkog vremenskog intervala, koristeći istu opremu u istom laboratoriju.

Međupreciznost, koja se još često naziva i ponovljivost unutar laboratorija, je različita od ponovljivosti, jer se procjenjuje u dužem periodu vremena od ponovljivosti (najčešće u periodu od nekoliko mjeseci). U obzir se uzima veći broj promjena radnih uvjeta od ponovljivosti. Radni uvjeti koji se mijenjaju su: analitičar, kalibracijske otopine, šarže reagenasa, kolone i drugi potrošni materijal. Navedeni radni uvjeti su konstantni tijekom jednog dana, ali se mijenjaju prilikom dužeg perioda, stoga je vrijednost međupreciznosti izražena kao standardna devijacija, generalno veća od ponovljivosti.

Obnovljivost se često naziva i ponovljivost između laboratorija, a izražava preciznost između mjerenja dobivenih u različitim laboratorijima. Obnovljivost, kao validacijski parametar, nije nužna, ako se metoda koristi samo unutar jednog laboratorija. No obnovljivost će biti vrlo koristan parametar ukoliko će se analitička metoda koristiti kao standardna metoda ili ako će biti korištena u više od jednog laboratorija

#### 2.4.6. Robusnost

Robusnost je osjetljivost analitičke metode na male promjene uvjeta ispitivanja u odnosu na različitost vrsta uzoraka, analita, uvjete pohrane, uvjete okoliša ili uvjete pripreme uzoraka pod kojima se metoda može primjenjivati onakva kakva jest ili uz utvrđene manje izmjene. Treba ukazati na sve uvjete ispitivanja koji bi u praksi mogli biti podložni promjenama, a mogu utjecati na rezultat analize (npr. stabilnost reagensa, sastav uzoraka, pH, temperatura, itd.) .

## 2.5. Kromatografija

Kromatografija je vrlo važna analitička tehnika koja omogućava separaciju, identifikaciju i pročišćavanje sastojaka smjese u svrhu kvalitativne i kvantitativne analize.

Svaki sustav za kromatografsko odjeljivanje sastoji se od dvije faze, mobilne (pokretne) faze i stacionarne (nepokretne) faze. Faktori koji utječu na opisani proces razdvajanja uključuju molekularne karakteristike povezane s adsorpcijom (tekuće-čvrsto), raspodjelom (tekuće-tekuće) i afinitetom ili različitosti u molekularnim masama odjeljivanih sastojaka smjese. Zbog opisanih karakteristika, neke se komponente duže zadržavaju na stacionarnoj fazi i kreću se sporije kroz kromatografski sustav, dok druge komponente prolaze brzo kroz stacionarnu fazu i napuštaju kromatografski sustav u kratkom vremenu.<sup>24</sup>

S obzirom na pojedina svojstva, kromatografske tehnike mogu se podijeliti na više načina. Uobičajene su tri podjele: prema agregatnom stanju pokretne faze, prema obliku kromatografske podloge i prema fizikalno-kemijskim procesima.

Osnovna podjela prema obliku kromatografske podloge ja na plošnu kromatografiju i kromatografiju na stupcu.

S obzirom na agregatno stanje pokretne faze, kromatografske se tehnike dijele na: tekućinsku kromatografiju (pokretna faza je tekućina), plinsku kromatografiju (pokretna faza plin) i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (pokretna faza fluid).<sup>26</sup>

Prema fizikalno-kemijskim procesima, odnosno prema mehanizmu odvajanja kromatografija se dijeli na: adsorpcijsku, razdjelnu, afinitetnu, ionsko-izmjenjivačku kromatografiju i kromatografiju isključenjem (tablica 2.).<sup>25</sup>

Tablica 2. Vrste kromatografije prema mehanizmu odjeljivanja sastojaka smjese<sup>25</sup>

Vrsta kromatografije	Mehanizam odvajanja
<b>Adsorpcijska kromatografija</b>	Različita adsorpcija sastojaka uzorka na površini čvrstog adsorbensa
<b>Razdjelna kromatografija</b>	Razlika u topljivosti sastojaka uzorka u nepokretnoj fazi (plinska kromatografija); razlika u topljivosti sastojaka uzorka u pokretnoj i nepokretnoj fazi (tekućinska kromatografija)
<b>Afinitetna kromatografija</b>	Specifične biološke interakcije analita i liganda na nepokretnoj fazi
<b>Ionsko-izmjenjivačka kromatografija</b>	Razlika u afinitetu sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni
<b>Kromatografija isključenjem</b>	Isključenje na temelju razlika u veličini i/ili obliku molekula

### 2.5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) je najčešće i najšire korištena kromatografska metoda zahvaljujući brzini i vrlo niskoj granici detekcije.<sup>25</sup>

U modernoj farmaceutskoj industriji tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je glavni analitički alat koji se primjenjuje u postupcima otkrića, razvoja i proizvodnje lijekovite tvari. Cjelokupan proces otkrića lijekovite tvari i razvoj proizvodnje iste je ispresijecan razvojem HPLC- separacijskih tehnika za svaki pojedini proces razvoja lijeka (rano otkriće aktivne farmaceutske tvari, metabolizam farmaceutske tvari, farmakokinetika, istraživanje procesa, predformulacija i formulacija). U svakoj pojedinoj fazi razvoja lijeka bezbroj uzoraka se podvrgava kontroli i praćenju kvalitete eventualnih budućih kandidata sastojaka lijeka. Brz i učinkovit razvoj metode je stoga od ogromne važnosti u cjelokupnom procesu razvoja lijeka. Učinkovita primjena HPLC zahtjeva kombinaciju različitih uvjeta, a to su: vrsta kolone i sastav pokretne faze, duljina i promjer kolone, protok pokretne faze, temperatura kolone i količina uzoraka. Stoga se i zahtjeva izvrsno poznavanje HPLC načela kako bi se moglo što bolje

optimirati mnoštvo varijabli, čime se dobiva brza i pouzdana HPLC analiza. Tehnikom HPLC provjerava se čistoća i kvaliteta lijekova te se uspješno primjenjuje za razdvajanje, kvalitativno i kvantitativno određivanje aktivne farmaceutske tvari, degradacijskih produkata, reakcijskih onečišćenja i sintetskih intermedijera.<sup>26</sup>

HPLC uređaj se sastoji do jednog ili više spremnika otapala, pumpe koja omogućuje protok mobilne faze, injektora za unošenje uzoraka, različitih vrsta detektora te programa za obradu podataka. Sustavom za unošenje uzoraka dovodi se uzorak na kolonu, a nakon toga na detektor. Protok mobilne faze kroz sustav može biti izokratan (sastav mobilne faze tijekom cijelog odjeljivanja je isti) ili gradijentan (sastav mobilne faze se mijenja tijekom analize).

Nakon odjeljivanja sastojaci se detektiraju različitim tipovima detektora, primjerice spektrofotometrom, detektorom s nizom fotosenzitivnih dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD), fluorescencijskim detektorom (engl. *Fluorescence Detector*, FLD), elektrokemijskim detektorom (engl. *Electrochemical Detector* ED), detektorom indeksa loma (engl. *Refractive Indeks Detector*, RID) ili detektorom raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku (engl. *Evaporative Light-Scattering Detector*, ELSD). Detektor je spojen na računalni sustav za obradu podataka koji uz pomoć električnog signala generira grafički zapis na ekranu, odnosno kromatogram. Poželjne osobine detektora su da je prvenstveno osjetljiv na niske koncentracije analita, da nije osjetljiv na promjene temperature i na sastav mobilne faze, te da osigurava linearan odgovor u širokom koncentracijskom području.

Danas se samostalno HPLC-tehnika rijetko koristi, već se većinom povezuje sa drugim analitičkim tehnikama. Neki od češće korištenih vezanih sustava su: tekućinska kromatografija i spektrometrija masa (LC-MS), zatim tekućinska kromatografija i nuklearna magnetska rezonancija (LC-NMR) te tekućinska kromatografija i infracrvena spektroskopija (LC-IR).

### 2.5.2. Kromatografski parametri

Prilikom razvoja kromatografske metode postoji niz parametara koji se optimiraju kako bi se postigli željeni rezultati, odnosno što bolje razdvajanje sastojaka smjese. Nadalje, važan dio svake metode je ispitivanje prikladnosti kromatografskog sustava u svrhu osiguravanja valjanog provođenja kromatografskog postupka. Razdvajanje komponenti smjese tekućinskom kromatografijom ovisi o prirodi sastojaka, pH-vrijednosti mobilne faze, punilu kolone, protoku, volumenu injektiranja, temperaturi kolone i tlaku.



Kromatogram je grafički prikaz odziva detektora u ovisnosti o volumenu ili vremenu. Položaj kromatografskog pika koristi se za kvalitativnu, a visina ili površina pika za kvantitativnu analizu.<sup>26</sup>

Jedan od glavnih parametara je vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ) koje daje kvalitativne informacije o ispitivanom spoju. Vrijeme zadržavanja je vrijeme koje je potrebno analiziranom spoju da nakon injektiranja dođe do detektora. Često se koristi prilagođeno vrijeme zadržavanja ( $t'R$ ), a ono predstavlja razliku između vremena zadržavanja ( $t_R$ ) i vremena zadržavanja sastojka koji prolazi kolonu bez zadržavanja ( $t_M$ ). Vrijeme potrebno analiziranom spoju da prođe kroz kolonu ovisi o faktoru zadržavanja ( $k$ ), koji predstavlja omjer vremena koje sastojak provede u nepokretnoj fazi i vremena u kojemu putuje u pokretnoj fazi.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

Parametri procjene djelotvornosti kolone su razlučivanje ( $R_S$ ) i faktor razdvajanja ( $\alpha$ ). Razlučivanje predstavlja mjeru djelotvornosti separacije dvaju kromatografskih pikova. Ukoliko je veće od 1,5 utoliko su dva susjedna pika na baznoj liniji odijeljeni. Računa se prema jednadžbi (2) gdje je su  $w_{b1}$  i  $w_{b2}$  širine pikova pri osnovici.

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (2)$$

Faktor razdvajanja je mjera razdvajanja dva spoja, pokazuje kako će dobro kromatografska kolona razdvojiti te spojeve i prema dogovoru, vrijednost mu je uvijek veća od 1.<sup>28</sup>

Djelotvornost kolone se izražava brojem teorijskih tavana ( $N$ ) i njihovom visinom ( $H$ ). Broj teorijskih tavana je broj uspostavljenih ravnoteža između mobilne i stacionarne faze, a računa se prema jednadžbi (3).

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad (3)$$

Djelotvornost kolone može se povećati smanjenjem visine tavana, odnosno povećanjem broja teorijskih tavana. Visina tavana predstavlja omjer dužine kolone ( $L$ ) i broja teorijskih tavana ( $N$ ) (4).

$$H = \frac{L}{N} \quad (4)$$

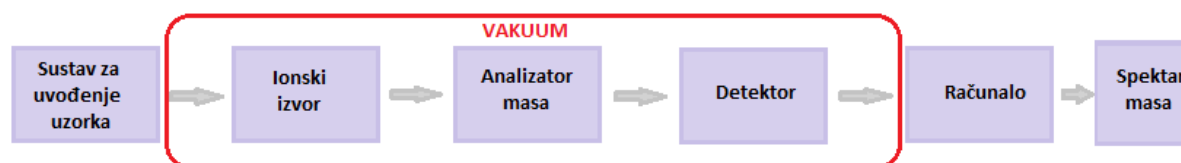
Važan parametar je i odabir pogodnih otapala za mobilnu fazu. Treba uzeti u obzir polarnost i pH-vrijednost otapala koja bi trebala biti dvije jedinice oko  $pK_a$  analita.

### 2.5.3. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC) je modificirani poboljšani oblik HPLC-a. Načela UHPLC su jednaka kao i kod HPLC-a, a osnovna razlika je da UHPLC instrumenti mogu podnijeti tlakove do čak  $10^8$  Pa, što je dvostruko veće u odnosu na HPLC instrumente. Druga bitna razlika je u veličini čestica kolone, koje su kod UHPLC instrumenata, promjera manjeg od 2  $\mu\text{m}$ . Zbog malih veličina čestica otopine koje se koriste za mobilne faze moraju biti ultračiste. Razvoj UHPLC tehnike donosi velike prednosti pred HPLC tehnikom. Kao što je primjerice potrošnja reagensa, vrijeme analize te bolje razlučivanje pikova, povećana selektivnost, te osjetljivost, stoga je UHPLC tehnika koja se vrlo često koristi u farmaceutskoj industriji.<sup>27</sup>

## 2.6. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS) je analitička instrumentna tehnika koja se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu molekula. Temelji se na nastajanju pozitivno i negativno nabijenih plinovitih iona koji se razdvajaju na osnovu razlike omjera njihove mase i naboja ( $m/z$ ). Glavna tri dijela instrumenta su: ionizator, analizador masa i detektor, slika 3.



Slika 3. Shematski prikaz spektrometra masa<sup>25</sup>

Sustav za uvođenje uzoraka dovodi uzorak u ionizacijsku komoru uz minimalno narušavanje vakuuma, što je omogućeno sustavom ventila koji parcijalno prekidaju i uspostavljaju određeni tlak. Nakon unosa uzoraka u instrument, prvi korak analize je ionizacija molekula u ionizatoru.

U ionskom izvoru molekule se ioniziraju na različite načine. Prilikom ionizacije mogu nastati pozitivno i negativno nabijeni ioni, ali se najčešće prate samo pozitivno nabijeni ioni, odnosno kationi. Postoje različiti postupci ionizacije, a najčešće primjenjivani su: ionizacija elektronima i kemijska ionizacija. Molekulski ioni nastali ionizacijom elektronima se često fragmentiraju na manje ione. Na temelju fragmentiranih iona moguće je odrediti strukturu molekule. Kemijska ionizacija predstavlja ionizaciju reakcijom molekula uzorka s ionima nastalim u nekom drugom procesu. Budući da se koristi manja energija nego u ionizaciji elektronima, veća je vjerojatnost određivanja molekulske mase, jer je vjerojatnije dobivanje molekulskog iona.<sup>28</sup> Izvori ionizacije dijele se na one kojima se uzorak najprije prevodi u plinsko stanje i zatim ionizira poput: kemijske ionizacije (engl. *Chemical Ionization*, CI) ili ionizacije elektronima (engl. *Electron Impact*, EI); te na izvore ionizacije u kojima se uzorak neposredno iz kondenzirane faze prevodi u ione poput matricom potpomognute ionizacije uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI) ili elektroraspršenja (engl. *Elektrospray Ionization*, ESI).

Najvažnija tehnika ionizacije u vezanom sustavu LC-MS je ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Elektrospray Ionization*, ESI). Ova tehnika ima široku primjenu, može se koristiti za ionizaciju polarnih i nepolarnih molekula, molekula malih i velikih molekulskih masa, nenabijenih ili ionskih spojeva ili pak za ionizaciju termički nestabilnih spojeva.<sup>29</sup>

Nakon uspješne ionizacije analita, ioni se razdvajaju u analizatoru masa. Ioni se razdvajaju na temelju njihovih omjera masa i naboja. Najčešće primjenjivani detektori su kvadrupolni analizator masa i analizator masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *Time of flight*, TOF). Analizator koji mjeri vrijeme leta razdvaja ione na temelju vrijednosti omjera njihove mase i naboja, odnosno na temelju brzine pojedinih iona. Uzmemo li u obzir da je početno ubrzanje za sve ione jednako, ioni s većim omjerom mase i naboja kasnije dolaze do detektora od iona manjih vrijednosti  $m/z$ . Na temelju vremena koje je potrebno pojedinom ionu da dođe do detektora, može se izračunati masa pojedinog iona.

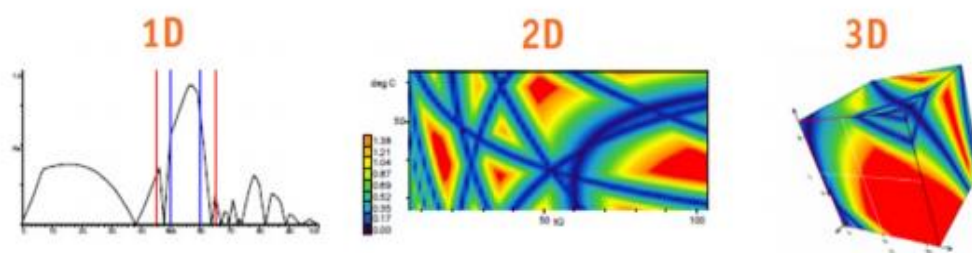
Kvadrupolni analizator masa sastoji se od četiri elektrode koje stvaraju oscilirajuće električno polje. Dvije nasuprotne elektrode su pozitivno nabijene, a druge dvije negativno. Ioni koji nastaju u ionizacijskoj komori dovode se u prostor između kvadrupolnih elektroda, gdje se primjenjuje kombinacija izmjeničnog i radiofrekventnog potencijala. Samo ioni koji imaju točno određeni omjer mase i naboja će rezonirati s kvadrupolnom frekvencijom i tada biti usmjereni ka detektoru. Kvadrupolni se detektori često spajaju u seriju.

Detektor je posljednji dio masenog spektrometra i u njega ulaze samo određeni ioni koji uspiju proći kroz analizator masa. S obzirom da samo mali broj prolazi kroz analizator masa i pada na detektor, signali na detektoru su vrlo slabi, pa ih je stoga nužno pojačati. Najpoznatiji detektori su: Faradayev cilindar, fotografska ploča i multiplikatori elektrona.

## 2.7. Program DryLab

Drylab je softverski program koji se koristi prilikom razvoja i optimizacije HPLC i UHPLC metoda u analitičkoj kemiji.<sup>30</sup> Cilj korištenja ovog programa je ubrzati i poboljšati efikasnost kromatografske analize. Neki od eksperimentalnih parametara koji se mogu odabrati su: pH-vrijednost mobilne faze, protok pokretne faze, temperatura kolone, način i trajanje eluiranja. Optimizacijom parametara uz pomoć programa smanjuje se vrijeme rutinske analize i omogućava bolja razlučivost kromatografskih pikova. Prvi korak u korištenju programa je definiranje ciljanog analitičkog profila, nakon čega DryLab softverski program predlaže sistematičan pristup i početne uvjete metode.

Početni dio svakog eksperimenta je odrediti ciljani analitički profil koji se određuje nakon nekoliko provedenih eksperimenata. Potom je potrebno mijenjati jedan ili više parametara i uspoređivati retencijska vremena komponenti u određenom uzorku. Nakon provedenih analiza, u softver se unose površine signala komponenti uzorka i retencijska vremena. Tijekom analize uvijek se injektiraju isti volumeni uzoraka kako bi program DryLab® automatski prepoznao pikove.<sup>31</sup> Parametri koji se najčešće mijenjaju su: temperatura kolone, vrijeme analize i pH-vrijednost pokretne faze, čime se dobiva trodimenzionalni prikaz ovisnosti jednog parametra o druga dva.<sup>32</sup> Pored trodimenzionalnog prikaza (3D), koriste se i dvodimenzionalni prikazi (2D) ali i jednodimenzionalni prikazi (1D) (slika 4.). Dvodimenzionalni grafički prikaz predstavlja ovisnosti promjene dva parametra, dok je 1D prikaz promjene jednog parametra na y-osi. Trodimenzionalni prikaz, u obliku kocke, je najčešće korišten prikaz, a u kojemu se preko njene površine očitavaju kritične vrijednosti. Takav prikaz pruža više informacija o rezoluciji i selektivnosti, odnosno o uvjetima potrebnima za potpuno razdvajanje pikova. Plavo obojene površine predstavljaju mjesta gdje je rezolucija kritična, tj. gdje su moguća preklapanja pikova ili neki drugi problemi u analizi, dok crveno obojene površine znače dobre uvjete za razdvajanje pikova.<sup>33</sup>



Slika 4. Grafički prikaz 1D, 2D i 3D kritičnih rezolucija<sup>33</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Popis polaznog materijala i kemikalija

Polazni popis polaznog materijala i kemikalija koje su korištene su navedeni u tablici 3.

Tablica 3. Popis korištenih kemikalija

Naziv kemikalije	Proizvođač	CAS broj*	Rok valjanosti
Acetamid	Sigma- Aldrich	60-35-5	11/2024
Metanol	VWR	67-56-1	05/2020
		Oznaka uzorka	
Elvitegravir	TAPI Pliva Hrvatska	OF-3095-27	/

Za sve provedene eksperimente korištena je voda ultravisoke čistoće (Milli-Q® Advantage A10 Water Purification System, Merck).

### 3.2. Priprema mobilne faze i diluenta

Kao diluent korištena je smjesa ultračiste vode i metanola (MeOH) u omjeru 1:1. Pomiješano je 500 mL vode i 500 mL MeOH.

U Tablici 4. prikazani su ishodi otapanja elvitegravira u različitim omjerima nekoliko otapala.

Tablica 4. Otapala korištena za otapanje elvitegravira

Otapalo	Omjer / %	Otopljeno
Ultračista voda	100	ne
Mravlja kiselina/ultračista voda	0,1:99,9	ne
Amonijak/ultračista voda	0,1:99,9	ne
Metanol	100	da
Metanol/mravlja kiselina/ultračista voda	49,5:49,5:1	ne
Metanol/amonijak/ultračista voda	49,5:49,5:1	da
Metanol/voda	50:50	ne

Obzirom na dobivene rezultate kao otapalo je izabrana smjesa smjesa vode ultravisoke čistoće, metanola i amonijevog hidroksida u omjeru 49,5:49,5:1.

### 3.3. Priprema otopina za UHPLC analizu

Temeljna standardna otopina acetamida koncentracije  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  pripravljena je vaganjem 10 mg acetamida i otopljena je u 10 mL otapala. Za bolje otapanje i degaziranje otopine korištena je vorteks mješalica i ultrazvučna kupelj.

Za ispitivanje linearnosti tijekom validacije pripravljene su tri osnovne standardne otopine acetamida otapanjem 10 mg u odmjernoj tikvici od 10 mL. Iz tri osnovne standardne otopine odgovarajućim razjedenjima pripravljeno je devet otopina različitih koncentracija acetamida ( $1 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $2 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $3 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $4 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $5 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $15 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $25 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $50 \text{ ng mL}^{-1}$ ).

Za procjenu iskorištenja metode odvagalo se je 21 puta 5 mg elvitegravira u tikvicu od 5 mL i otopilo u odgovarajućoj otopini acetamida:

- prve tri odvage otopile su se u otopini acetamida koncentracije  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  pripravljenoj u smjesi metanola i ultračiste vode (1:1)

- druge tri odvage otopile su se u otopini acetamida koncentracije  $3 \text{ ng mL}^{-1}$  pripremljenoj u smjesi metanola i ultračiste vode (1:1)
- treće tri odvage otopile su se u otopini acetamida koncentracije  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  pripremljenoj u smjesi metanola i ultračiste vode (1:1)
- četvrte tri odvage otopile su se u otopini acetamida koncentracije  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  pripremljenoj u smjesi metanola i ultračiste vode (1:1)
- pete tri odvage otopile su se u otopini acetamida koncentracije  $25 \text{ ng mL}^{-1}$  pripremljenoj u smjesi metanola i ultračiste vode (1:1)
- šeste tri odvage otopile su se u otopini acetamida koncentracije  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  pripremljenoj u smjesi metanola i ultračiste vode (1:1)
- sedme tri odvage otopile su se u smjesi metanola i ultračiste vode (1:1)

### 3.4. Kromatografski uvjeti za određivanje acetamida u elvitegraviru

Kromatografski uvjeti određivanja acetamida u elvitegraviru dani su u tablici 5.

Tablica 5. Optimalni kromatografski uvjeti za određivanje acetamida u elvitegraviru

Kolona i pakiranje	WATERS Acquity BEH C18, 100 x 2,1 mm, 1,7 $\mu\text{m}$		
<b>Eluens A</b>	0,1% mravlja kiselina u vodi		
<b>Eluens B</b>	0,1% mravlja kiselina u metanol		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	95	5
	2,00	95	5
	2,01	10	90
	3,01	95	5
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	1 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 $\text{mL min}^{-1}$		
<b>Temperatura kolone</b>	50 $^{\circ}\text{C}$		
<b>Detektor</b>	MRM		



## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

U svrhu dobivanja što većeg intenziteta signala pri snimanju na spektrometru masa, potrebno je optimirati uvjete rada spektrometra masa, a nakon toga i kromatografske uvjete.

### 4.1. Uvjeti i optimizacija parametara spektrometra masa

#### 4.1.1. Energija sraza

Za dobivanje što bolje osjetljivosti, potrebno je optimirati uvjete snimanja spektrometra masa kako bi se dobili što intenzivniji signali. Budući da su se željeli pratiti signali molekuskog iona acetamida pri  $m/z=60$  i iona fragmenta pri  $m/z=44$ , prvo je mijenjana energija sraza od 0-30 eV (tablica 6). Injektirana je otopina standarda acetamida koncentracije  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ . U prvom kvadrupolu mjereno je intenzitet signala iona pri  $m/z=60$ , a u trećem kvadrupolu je mjereno intenzitet signala iona pri  $m/z=44$ .

Tablica 6. Odziv detektora u ovisnosti o energiji sraza

Energija sraza / eV	Intenzitet signala
0	16500
10	18300
20	33200
30	31500

Na temelju podataka prikazanih u tablici 6. za daljnje mjerenje je izabrana energija sraza od 20 eV.

#### 4.1.2. Temperatura plina

Nakon što se prilagodila energija sraza, podešavala se je temperatura plina. Ispitane su tri temperature plina, uz konstantnu enegriju sraza od 20 eV, 200 °C, 225 °C i 250 °C. Injektirana je otopina acetamida koncentracije 1 ng mL<sup>-1</sup>.

Tablica 7. Odziv detektora pri različitim temperaturama plina

Temperatura plina / °C	Intenzitet signala
<b>200</b>	29960
<b>225</b>	32200
<b>250</b>	33800

Za daljnji razvoj metode izabrana je temperatura od 250 °C.

#### 4.1.3. Napon na kapilari

Ispitan je utjecaj napona na kapilari. Ispitani su naponi od 1500 V, 2500 V i 3000 V, uz energiju sraza od 20 eV i temperaturu plina od 250 °C. Injektirana je otopina radnog standarda acetamida koncentracije 1 ng mL<sup>-1</sup> te su mjereni intenziteti signala.

Tablica 8. Odziv detektora pri različitim naponima na kapilari

Napon na kapilari / V	Intenzitet signala
<b>1500</b>	27190
<b>2500</b>	28430
<b>3000</b>	29870

Iz tablice 8 zaključujemo da je najveći intenzitet signala zabilježen uz napon od 3000 V.

#### 4.1.4. Parametri spektrometra masa

Optimizacijom energije sraza, temperature plina te napona na kapilari, podešeni su krajnji uvjeti na spektrometru masa:

- napon fragmentatora: 380 V
- napon na kapilari: 3000 V
- temperatura plina: 250 °C
- protok plina: 15 L min<sup>-1</sup>
- tlak raspršivača: 20 psi
- temperatura plina za formiranje kapljica (engl. *sheat gas*): 400 °C
- energija sraza: 20 eV

## 4.2. Optimizacija UPLC metode

Optimizacija UHPLC metode uključivala je odabir optimalne stacionarne faze, modifikatora pokretnih faza i različite omjere otapala u pokretnoj fazi.

### 4.2.1. Odabir stacionarne faze

Pri odabiru nepokretne faze testirane su kolone punjene reverznim fazama C8, C18 i fenilna nepokretna faza.

Kao pokretna faza korištena je 0,1 % mravlja kiselina u vodi i 0,1 % mravlja kiselina u metanolu, a kao faktor odabira korišten je faktor simetrije pika (engl. *tailing*,  $T$ ) i broj teorijskih tavana ( $N$ ) pika acetamida. Korištena je otopina radnog standarda acetamida u smjesi s elvitergavirom koncentracije 20 ng mL<sup>-1</sup> acetamida i elvitergravira 1 mg mL<sup>-1</sup>. Rezultati se nalaze u tablici 9.

Tablica 9. Rezultati analize korištenjem različitih punjenja kolone

Nepokretna faza	$N$	$T$
C18	52350	1,008
C8	47520	0,953
Fenilna	39405	0,890

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da nepokretna faza punjena C18 reverznom fazom najpogodnija za određivanje acetamida u elvitegraviru.

### 4.2.2. Odabir modifikatora

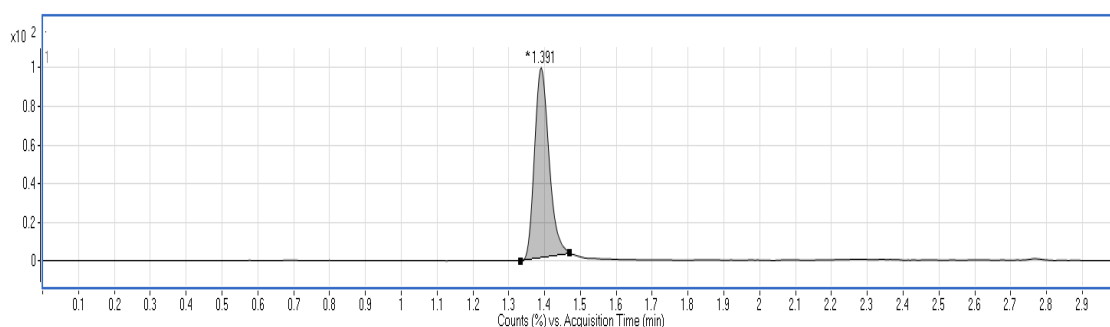
Kako se kao detektor za određivanje acetamida u elvitegraviru koristio spektrometar masa, ispitani su lako hlapivi modifikatori – mravlja kiselina i amonijev hidroksid, koji su dodavni u pokretnu fazu u omjeru 0,1 %. Kao faktor odabira korišten je faktor simetrije pika (engl. *tailing*,

$T$ ) i broj teorijskih tavana ( $N$ ). U eksperimentima je korištena Waters BEH C18 kolona dimenzija  $100 \times 2,1$  mm,  $1,7 \mu\text{m}$ .

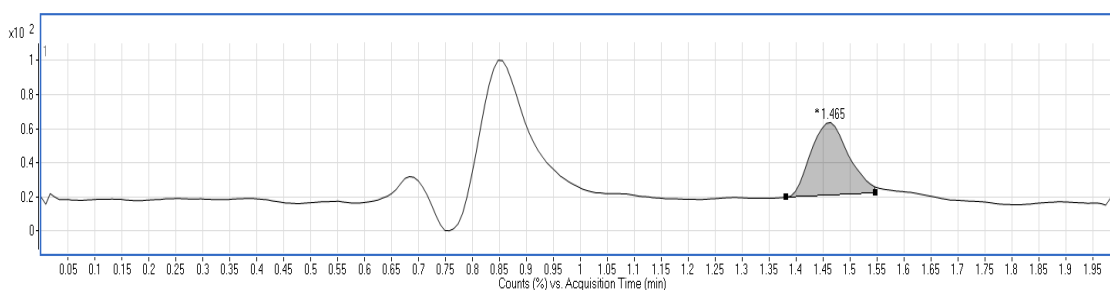
Rezultati s amonijevim hidroksidom ukazuju na lošiju simetriju i broj teoretskih tavana jer je pH pokretne faze blizu konstanti disocijacije, tablica 10 i slike 5. i 6. Zbog toga amonijev hidroksid nije pogodan za određivanje sadržaja acetamida u elvitegraviru.

Tablica 10. Rezultati analize korištenjem dvaju modifikatora

Modifikator	$N$	$T$
0,1 % mravlja kiselina	52350	1,008
0,1 % amonijev hidroksid	22581	0,652



Slika 5. Kromatogram. Mravlja kiselina 0,1%, BEH C18,  $1 \text{ ng mL}^{-1}$



Slika 6. Kromatogram. Amonijev hidroksid 0,1%, BEH C18,  $1 \text{ ng mL}^{-1}$

#### 4.2.3. Odabir otapala u pokretnoj fazi

Odabir otapala u pokretnoj fazi je izrazito bitan prilikom optimizacije metode. Cilj je bio izabrati optimalan omjer početnih otapala koji će omogućiti brzu i preciznu analizu.

Ispitani su različiti omjeri početnih otapala, a kao optimalno je izabran udio vode/metanola/mravlje kiseline u omjeru 950:50:1.

#### 4.2.4. Optimalni kromatografski uvjeti za određivanje acetamida u elvitegraviru

Nakon optimiranja svih parametara može se provesti mjerenje prema parametrima u tablici 11.

Tablica 11. Optimalni kromatografski uvjeti za određivanje acetamida u elvitegraviru

Kolona i pakiranje	WATERS Acquity BEH C18, 100 × 2,1 mm, 1,7 μm		
Eluens A	0,1% mravlja kiselina u vodi		
Eluens B	0,1% mravlja kiselina u metanolu		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	95	5
	2,00	95	5
	2,01	10	90
	3,01	95	5
Vrijeme stabilizacije	1 min		
Volumen injektiranja	1 μL		
Protok	0,4 mL min <sup>-1</sup>		
Temperatura kolone	50 °C		
Detektor	MRM		

### 4.3. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije

Nakon odabira prikladnog otapala i prilagođavanja kromatografskih uvjeta te uvjeta spektrometra masa, potrebno je optimirati uvjete ultrazvučne ekstrakcije acetamida. Mjereni su intenziteti signala acetamida u elvitegraviru u ovisnosti o vremenu provedenom u ultrazvučnoj kupelji, rezultati se nalaze u Tablici 12.

Tablica 12. Odziv detektora nakon različitih vremena provedenih u ultrazvučnoj kupelji

Vrijeme provedeno na ultrazvučnoj kupelji	Odziv	Vrijeme provedeno na ultrazvučnoj kupelji	Odziv
0 minuta	29520	60 minuta	89220
10 minuta	36520	70 minuta	90150
20 minuta	62490	80 minuta	88550
30 minuta	79650	90 minuta	89145
40 minuta	83190	100 minuta	89150
50 minuta	89620		

#### 4.4. Validacija metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za određivanje acetamida

Metoda za određivanje sadržaja acetamida u elvitegraviru UHPLC-QQQ validirana je u skladu s ICH smjernicama.<sup>23</sup> Sljedeće izvedbene značajke metode su određene: specifičnost, prikladnost sustava, linearost, točnost, preciznost, iskorištenje, granice kvantifikacije i detekcije, robusnost i stabilnost otopine.

##### 4.4.1. Specifičnost i selektivnost

Specifičnost je sposobnost metode da razlikuje analit od ostalih komponenti uzorka ili matriksa uzorka bez interferencija ostalih komponenti sličnog ponašanja, i indikativno je svojstvo za više tvari. S obzirom na to da se kao detektor u metodi koristio trostruki kvadrupol, čistoća svakog uzorka i standarda je potvrđena tako da je propušтана molarna masa acetamida kroz prvi kvadrupol i kroz treći kvadrupol te je mjerena fragment od  $m/z= 44$ , na taj način je potvrđena selektivnost metode.

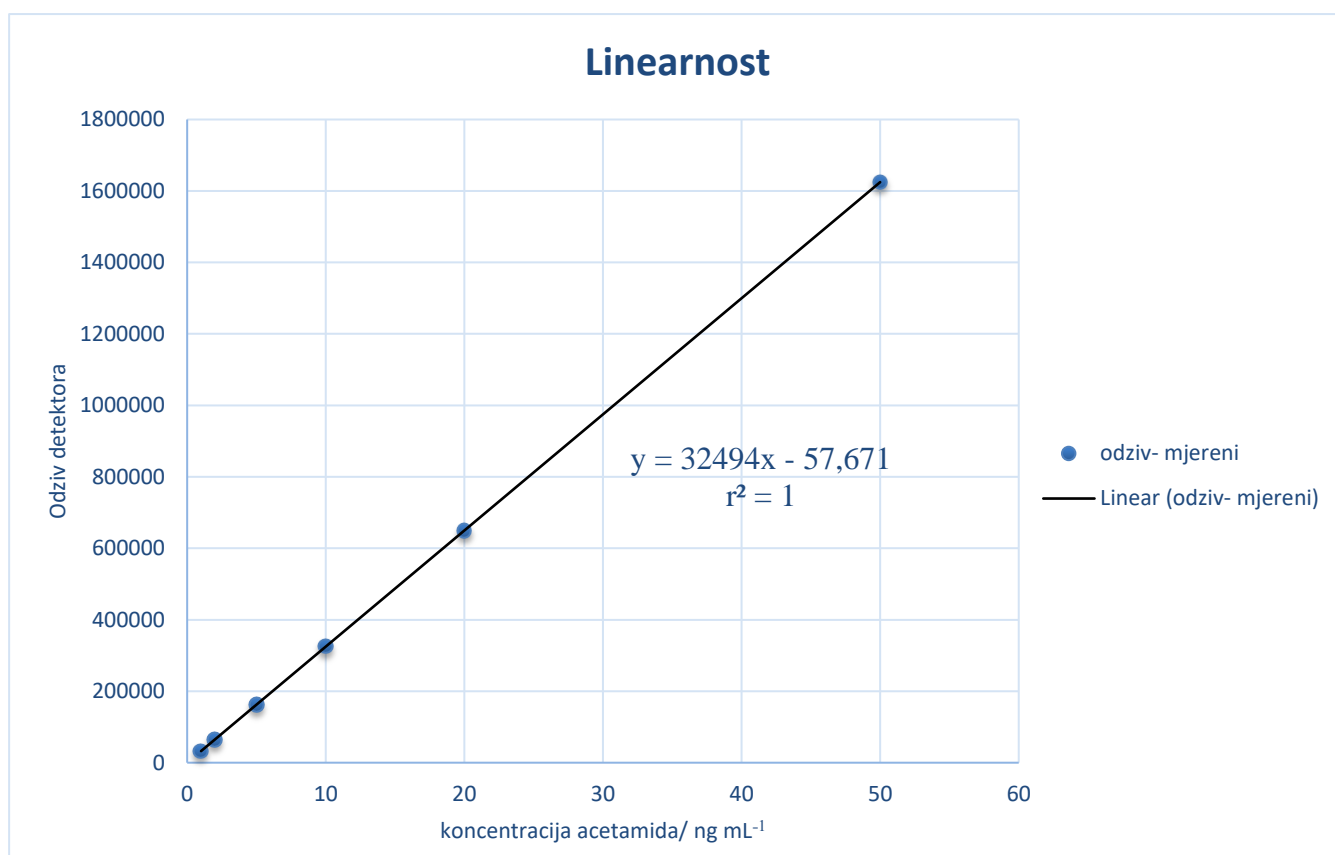
##### 4.4.2. Linearost

Linearost je potvrđena koeficijentom korelacije ( $r^2$ ) koji je  $\geq 0,999$ ). Ovisnost signala o koncentraciji prikazana je grafički te je određen nagib i odsječak pravca i koeficijent korelacije ( $r^2$ ). RSD (%) nagiba pravca i odsječka na *ordinati* manji je od 2,0 % za acetamid.

Tablica 13. Ovisnost odziva o koncentraciji acetamida u otopini

Koncentracija acetamida / ng mL <sup>-1</sup>	Intenzitet signala
1	31600
2	64950
5	163250
10	326145
20	650750
50	1658650





Slika 7. Ovisnost odziva detektora o koncentraciji acetamida

Tablica 14. Izračunate vrijednosti standardne devijacije iz jednadžbe pravca

Analit	$n$	Odsječak ( $a$ )	Nagib pravca ( $b$ )	$r^2$	RSS
<b>Acetamid</b>	5	32494	57,7	1,000	0,001

#### 4.4.3. Granice kvantifikacije i detekcije

Prema smjernicama, kriterij odnosa signala i šuma za granicu kvantifikacije je 10, a za granicu detekcije 3. S obzirom na to da se u radu koristio spektrometar masa izmjerena je otopina 1 ng mL<sup>-1</sup> radnog standarda acetamida te je ista otopina injektirana 6 puta. Izmjerene su površine, omjer signala i šuma, te je iz površina izračunata relativna standardna devijacija (tablica 15). Iz odnosa signala i šuma određena je granica detekcije računski i ona iznosi otprilike 30 pg mL<sup>-1</sup>.

Tablica 15. Rezultati ispitivanja granice kvantifikacije i detekcije

Injektiranje	Koncentracija / ng mL <sup>-1</sup>	Intenzitet signala	S/N
1	1	31500	15
2	1	31750	15
3	1	31950	10
4	1	32525	10
5	1	31890	11
6	1	32320	11
RSD		1,173352	

#### 4.4.4. Točnost i iskorištenje

Potvrđena je točnost kvantifikacije acetamida tako da je iz nagiba pravca izračunata teorijska površina te je uspoređena s mjernim površinama. Tako izračunati podatci nalaze se u tablici 16, gdje je vidljivo da je iskorištenje metode 99,9%-100,2%

Tablica 16. Rezultati ispitivanja točnosti i iskorištenja za metodu UHPLC-QQQ

Koncentracija/ ng mL <sup>-1</sup>	Odziv - mjereni	Odziv - računski	Iskorištenje / %
1	32500	32436,33	100,2
2	64850	64930,33	99,9
5	162250	162412,3	99,9
10	325145	324882,3	100,1
20	649750	649822,3	100,0
50	1624650	1624642	100,0

## 4.4.5. Preciznost

Prilikom ispitivanja preciznosti metode, ispitane su sljedeće značajke metode, ispitana je preciznost instrumenta tako da se acetamid koncentracije  $2 \text{ ng mL}^{-1}$  otopio u otopini elvitegravira  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  koja se pripremila po opisanom postupku te se injektirala 6 puta zaredom, prilikom čega je izračunato iskorištenje također izračunata je relativna standardna devijacija sadržaja acetamida (RSD%), rezultati se nalaze u tablici 17.

Tablica 17. Rezultati ispitivanja preciznosti za metodu UHPLC-QQQ

Broj injektiranja	Acetamid / ppm (%)
1	1,99
2	1,95
3	1,97
4	2,01
5	1,99
6	1,99
RSD(%)	0,298

Ispitana je i ponovljivost metode na način da se isti kontrolni broj elvitegravira pripremio šest puta na isti način te je načinjena analiza. Iz dobivenog odziva izračunat je udio acetamida u tableti. Izračunata je i relativna standardna devijacija, a rezultati se nalaze u tablici 18.

Tablica 18. Rezultati ispitivanja ponovljivosti za metodu UHPLC-QQQ

Priprema	Udio acetamida u tableti / %
1	1,99
2	1,97
3	2,01
4	2,02
5	2,04
6	2,05
RSD(%)	1,9

Međupreciznost je određena na način da je drugi analitičar napravio analizu kontrolnih brojeva elvitegravira s acetamidom pri koncentraciji od 2 ng mL<sup>-1</sup> kao i analitičar dan prije te su dobiveni rezultati uspoređeni. Rezultati ispitivanja rezultata nalaze se u tablici 19.

Tablica 19. Rezultati određivanja međupreciznosti za metodu UHPLC-QQQ

Priprema	Analitičar I	Analitičar II
	Udio acetamida / %	Udio acetamida / %
1	1,96	1,98
2	1,97	1,98
3	1,98	1,99
4	2,01	2,01
5	2,02	2,04
6	2,03	2,05
Srednja vrijednost	2,0	2,0
RSD(%)	0,9	0,9

#### 4.4.6. Stabilnost

Stabilnost je ispitana tako da se otopina standarda i uzorak ostave u tikvici tijekom perioda od 7 dana te su mjerni intenziteti signala standarda prema svježe pripremljenom standardu, a uzorak je kvantificiran prema svježoj pripremi standarda. Rezultati se nalaze u tablici 20.

Tablica 20. Rezultati ispitivanja stabilnosti u periodu od 7 dana

Dan	Standard -iskorištenje / %
0	/
1	99,9
2	100,1
3	99,5
4	99,6
5	99,2
6	99,8
7	99,2

#### 4.4.7. Robusnost

Robusnost je ispitana na način da su mijenjani parametri metode poput protoka, temperature kolone i udjela mravlje kiseline u pokretnoj fazi. Ista serija elvitegravira pripremljena je s acetamidom i izmjerena te su uspoređeni dobiveni rezultati (tablica 21).

Tablica 21. Rezultati ispitivanja robusnosti za metodu UHPLC-QQQ

Parametar	Iskorištenje / %
prema metodi	99,6
protok + 0,05 mL/min	99,8
protok – 0,05 mL/min	99,7
Temperatura kolone +5C	99,4
Temperatura kolone -5C	99,3
mravlja kiselina + 0,1mL	100,1
mravlja kiselina- 0,1mL	99,9

## § 5. ZAKLJUČAK

Cilj rada bio je razviti brzu, učinkovitu i djelotvornu metodu za analizu acetamida u lijeku elvitegraviru. Za razdvajanje i kvantitativno određivanje acetamida koristio se tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti sa detektorom spetrometrom masa sa trostrukim kvadrupolom.

Prvi korak u razvoju metode je bio pronaći optimalne uvjete za detekciju spojeva spektrometrom masa. Podešavali su se parametri, energija sraza, temperatura plina i napon na kapilari. Optimizacija uvjeta kromatografskog odjeljivanja provedena je ispitivanjem različitih stacionarnih faza i modifikatora. Najbolje odjeljivanje postignuto je na C18 stacionarnoj fazi uz mravlju kiselinu kao modifikator.

U ovom radu određene su sljedeće izvedbene značajke metode: specifičnost, prikladnost sustava, linearost, točnost, preciznost, iskorištenje, granice kvantifikacije i detekcije, robusnost i stabilnost otopine. Metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti validirana je u skladu s ICH smjernicama, područje primjene metode je od 1 do 50 ng mL<sup>-1</sup> pri čemu je dokazana granica kvantifikacije od 1 ng mL<sup>-1</sup> i granica detekcije od 30 pg mL<sup>-1</sup>.

Dobiveni rezultati pokazuju da je metoda precizna, ponovljiva, obnovljiva, robusna te da varijacije u protoku i temperaturi kolone ne utječu značajno na dobivene rezultate.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Oznake, kratice i simbole treba poredati abecednim redom.

Oznaka	Naziv
<b>AIDS</b>	sindrom stečene imunodeficijencije
<b>API</b>	aktivna farmaceutska tvar
<b>CI</b>	kemijska ionizacija
<b>DAD</b>	detektor s nizom dioda
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina
<b>ED</b>	elektrokemijski detektor
<b>EI</b>	ionizacija elektronima
<b>ELSD</b>	detektorom raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku
<b>ELV</b>	elvitegravir
<b>ESI</b>	ionizacija elektroraspršenjem
<b>FAB</b>	bombardiranje brzim atomima
<b>FLD</b>	fluorescencijski detektor
<b>H</b>	visina kromatografskog pika
<b>HAART</b>	visokokomponentna antiretrovirusna terapija
<b>HIV</b>	virus humane imunodeficijencije
<b>HPLC</b>	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
<b>ICH</b>	međunarodna konferencija o harmonizaciji
<b>k</b>	faktor zadržavanja
<b>L</b>	dužina kromatografske kolone
<b>LC-IR</b>	tekućinska kromatografija spregnuta s infracrvenom spektroskopijom
<b>LC-MS</b>	tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometijom masa
<b>LC-NMR</b>	tekućinska kromatografija spregnuta s nuklearnom magnetskom rezonancijom
<b>MALDI</b>	matricom potpomognuta ionizacije uz desorpciju laserskim zračenjem

<b>MIP</b>	molekularno utisnuti polimeri
<b>MS</b>	spektrometrija masa
<b>MRM</b>	praćenje višestrukih rekacija
<b>QQQ</b>	trostruki kvadрупol
<b>RID</b>	detektor indeksa loma
<b>RNA</b>	ribonukleinsk kiselina
<b>TOF</b>	detektor koji mjeri vrijeme leta
<b>UHPLC</b>	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti
<b><math>\alpha</math></b>	faktor odjeljivanja



## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. Sertić, *Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina*, Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2013, str. 16.
2. T. Wills, V. Vega, *Expert Opin. Investig. Drugs* **21** (2012) 395–401.
3. M. Simiele, A. Ariaudo, A. De Nicolò, F. Favata, M. Ferrante, C. Carcieri, S. Bonora, G. Di Perri, A. D’Avolio, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **138** (2017) 223–230.
4. Z. Djerada, C. Feliu, C. Tournois, D. Vautier, L. Binet, A. Robinet, H. Marty, C. Gozalo, D. Lamiable, H. Millart, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **86** (2013) 100–111.
5. S. Ramanathan, A. A. Mathias, P. German, B. P. Kearney, *Clin Pharmacokinet.* **50** (2011) 229–244.
6. M. E Abram, R. M. Hluhanich, D. D. Goodman, K. N. Andreatta, N. A. Matgot, L. Ye, A. Niedziela-Majka, T. L Barnes, N. Novikov, X. Chen, E. S. Svarovskaia, D. J. McVoll, K. L. White, M. D. Miller, *Antimicrob. Agents Chemother* **57** (2013) 2654–2663.
7. Europska Medicinska agencija, sažetak za javnost [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/stribild-epar-summary-public\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/stribild-epar-summary-public_hr.pdf) ( datum pristupa: 20. listopada 2019.)
8. German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup ‘Assessment of Pathogens Transmissible by Blood . Human immunodeficiency viruses (HIV) , *Transfus Med Hemother.* **43** (2016) 203–222.
9. Theoretical Biology and Biophysics Group T-6, *HIV Sequence Compendium*, Los Alamos National Lab, 2012, 5-7 .
10. M. S. Cohen, G. M. Shaw, A. J. McMichael, B. F. Haynes, *N Engl J Med*, **364** (2011) 1943-1954
11. <https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html> ( datum pristupa: 20. listopada 2019.)
12. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical_en.pdf) (datum pristupa 10.studenog.2019.)
13. N. Rama Rao; S. S. Mani Kiran, *Indian J. Pharm. Educ. Res.* **44** (2010) 301–306.

14. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical_en.pdf) (datum pristupa 7. studenog 2019).
15. G. Székely, E. Fritz, J. Bandarra, W. Heggie, B. Sellergren. *J. Chromatogr. A* **1240** (2012) 52–58.
16. M. Runje, *Razvoj analitičkih metoda za određivanje onečišćenja u djelatnoj farmaceutskoj tvari nepafenaku*, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 32.
17. Z. Lasić, *Razvoj metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za analizu razgradnih produkata lijeka elvitegravira*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 45.
18. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/acetamide.pdf> (datum pristupa 20. studenog 2019.)
19. T. McGovern, D. Jacobson-Kram, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **25 (8)** (2006) 790–795.
20. B. A. Olsen, B. C. Castle, D. P. Myers, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **25 (8)** (2006) 796–805.
21. K. Ferenczi-Fodor, Z. Végh, B. Renger, *TrAC Trends Anal. Chem.* **25 (8)** (2006) 778–789.
22. European medicines agency, ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1995.
23. ICH Harmonised tripartite guideline, Pharmaceutical development Q8(R2), 2009
24. L. K. Dow, M. M. Hansen, B. W. Pack, T. J. Page, S. W. Baertschi *J. Pharm. Sci.* **102** (2013) 1404-1418.
25. N. Galić, V. Drevenkar, *Kromatografija*, Zagreb, 2006
26. D. A. Skoog, D. M. West, J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb 1999, str. 645–674.
27. Y. Kazakevich, R. Lobrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, Wiley, New Jersey 2007, str. 3
28. M. Kaštelan-Macan, *Enciklopedijski riječnik analitičkog nazivlja*, Mentor d.o.o., Zagreb, 2014, 97–99

29. M. Kovačević, *Identifikacija razgradnih produkata ceritiniba vezanim sustavom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i tandemne spektrometrije masa*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019.
30. S. H. Pine, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1999, str. 1121.
31. E. Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Wiley, New Jersey, 2007, str. 33–36.
32. *DryLab®V4.O*, Molnar-institute, <http://molnar-institute.com/drylab/> (datum pristupa 20.listopada 2019.)
33. I. Molnar, *J. Chromatogr. A* **965** (2002) 175–194.

## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Franciska Grgić

Datum rođenja: 28. studenog 1995.

Mjesto rođenja: Osijek, Republika Hrvatska

### Obrazovanje

2002.–2010. Osnovna škola Dobriše Cesarića u Osijeku

2010.–2014. 1. gimnazija u Osijeku

2014.-2017. Preddiplomski studij kemije, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek

Završni rad: Priprava organskih soli primarnih amina s derivatima dipikolinske kiseline, mentor: doc.dr.sc. Tomislav Balić

2017.–2020. Diplomski sveučilišni studij Kemija; smjer: istraživački, grane: analitička kemija i biokemija, Prirodoslovno matematički faultet u Zagrebu

### Stručna praksa

svibanj- listopad 2019. - Medicinski fakultet u Beču, Institut za medicinsku kemiju i patobiokemiju, Beč, program stipendija – CEEPUS, mentor: univ.prof. Barbara Scheiber-Mojdehkar, Tema: Neurodegeneracija povezana s akumulacijom željeza u mozgu

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Franciska Grgić, Hana Rimanić, Marijana Pocrnić, Darko Kontrec, Ana Budimir, Nives Galić Complexation of lanthanides by aroylhydrazones derived from nicotinic acid hydrazide: spectrophotometric determination, 26th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers (26HSKIKI) with international participation, held from 9 – 12 April 2019 in Šibenik, Croatia – **Postersko priopćenje**

2. Franciska Grgić, Barbara Scheiber-Mojdehkar, Assessment of concentrations of labile iron content in different intravenous iron preparations, ÖGMBT ( Austrian Association of Molecular Life Sciences and Biotechnology) Annual Meeting, September 16-18, 2019 in Salzburg, Austria – **Postersko priopćenje**